

## INDICADORES CLÍNICOS DEL BALANCE REDOX, UNA HERRAMIENTA INDISPENSABLE PARA LAS INVESTIGACIONES DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

*Gregorio Martínez Sánchez<sup>a</sup>; Attilia Giuliani<sup>b</sup>; Rosemeres Horwat Delaporte<sup>c</sup>; Olga Sonia León Fernández<sup>a</sup>.*

<sup>a</sup>Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba. E-Mail [gregorio@cieb.sld.cu](mailto:gregorio@cieb.sld.cu). <sup>b</sup>Dep. of Chemistry and Medical Biochemistry, Univ. of Milan, Via Saldini 50-20133 Milan, Italy.

<sup>c</sup>Instituto Superior de Ciências Farmacêuticas e Bioquímica da Universidade Paranaense – UNIPAR-Umuarama, Pr. Brazil. E-mail: [delaporte@unipar.br](mailto:delaporte@unipar.br).

---

**Abstract. [Clinical Biomarkers of Oxidative stress, an essential tool for clinical investigation]** The methodology for the detection of the oxidative stress status at world level is disperses. In occasions useful methods are used for the investigation but they has non applicable to the clinic diagnostic. In Cuba in spite of having a high prevalence of illnesses in which Reactive Oxygen Species are involved (cancer, diabetes, auto-immune illnesses, cardiovascular and others) an integral diagnostic systems have not been developed. It is also insufficient the education and preparation of the professional personnel (doctors and related health personnel) to face the analysis of the data that contributes to a antioxidant/pro-oxidant diagnostic and to impact in the modification of life habits and other measure directed to correct the redox disruption

The objectives of this study was to validate a group of analytic methods for the diagnosis of the oxidative stress. The validated analytic methodology was permit to establish the reference values in normal populations, an individualized diagnostic as base to establish the adequate medical prescription, to fallow the evolution of chronic oxidative disorder and follow the effect of nutritional or pharmacological intervention. The methodology include clinical marker of biomolecule damage, antioxidant enzymes, concentration of low level antioxidant, an indicator of total antioxidant status. The analytic methodology was adaptable to micro and ultramicro analytic systems and was validated according to the international recommendations.

---

*Palabras claves:* Estrés oxidativo, radicales libres, diagnóstico clínico, balance redox, especies reactivas del oxígeno.

## **Introducción:**

El impacto del desequilibrio redox en la salud humana, constituye una dirección investigativa de repercusión en el orden científico y social. Actualmente se impulsa, promueve y desarrollan nuevos descubrimientos en este campo científico, como son: mecanismos asociados a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, biomarcadores de la evolución, procesos de envejecimiento, citoquinas, factores de transcripción y otros (6th Annual Meeting of the Oxygen Society, Noviembre 18-22, 1999, New Orleans, L.A., USA). El estado redox celular ha sido reconocido, de forma cada vez más creciente, como un componente crítico de enfermedades y respuestas celulares, inducidas por el estrés. Inherente a estas respuestas está la generación de ERO las cuales provocan daño celular directo, además de actuar como segundos mensajeros intracelulares, modulando las vías de transducción de señales. El desbalance entre la generación de ERO y los sistemas de defensas antioxidantes conlleva a modificaciones químicas de macromoléculas de relevancia biológica. Este desbalance se asocia a mecanismos fisiopatológicos para la iniciación y desarrollo de enfermedades de notable incidencia de morbi-mortalidad (aterosclerosis, cáncer, enfermedades del Sistema Nervioso Central, enfermedades autoinmunes, daño por isquemia-reperfusión, entre otras) y tiene lugar por la presencia de factores evitables o no. La generalidad de estos estados fisiopatológicos se han asociado a ciertos hábitos de vida que incluyen aquellos relacionados con la dieta. Los datos experimentales aportan evidencias de la importancia de los antioxidantes en sistemas que capturan ERO. La relevancia *in vivo* de estas observaciones depende del conocimiento acerca del consumo, y distribución del antioxidante en el organismo humano, y qué niveles de antioxidantes puede esperarse que se localicen en tejido y su relación con aquellos ingeridos a través de la dieta. La metodología para la detección del estado del balance redox es a nivel mundial dispersa, en ocasiones se emplean métodos útiles para la investigación pero no extrapolables a la clínica. En Cuba a pesar de haber una alta prevalencia de enfermedades mediadas por las ERO (cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares y otras) no se han desarrollado sistemas de diagnóstico a tales fines. Es además insuficiente la educación y preparación del personal profesional (médicos y personal vinculado a la salud) para enfrentar el análisis de los datos

que aporte un diagnóstico redox e incidir en la modificación de hábitos de vida y otras medida dirigidas a corregir la disrupción redox.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología desarrollada en general involucra la medición de indicadores de daño a biomoléculas, indicadores globales del balance redox, antioxidantes solubles y enzimas antioxidantes. **Glutacion reducido:** Se empleó el método de Sedlak y Lindsay, 1968 que emplea el reactivo de Ellman's (ácido 5,5' ditio-bis (2-nitrobenzoico)  $10^{-2}$ M. Determinación de **Vitamina C** en Plasma mediante el método que emplea la reducción del  $\text{FeCl}_3$  por el ácido ascórbico a  $\text{Fe}^{2+}$  y la reacción consecutiva con el 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) Motchnik *et al.*,1994. Los **peróxidos totales** presentes en la muestra, convierten el  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  en medio ácido. El  $\text{Fe}^{3+}$  forma un complejo coloreado con el xilenol naranja que es detectable por medición espectrofotométrica a 560 nm (Bioxytech H2O2-560 (Cat. 21024) de Oxis internacional Inc. Portland, USA). **Productos de la oxidación avanzada de proteínas:** indicador de la ocurrencia de reacciones de condensación y fragmentación de estas biomoléculas. Se determinó siguiendo la transformación de los iones yodo a yodo diatómico que provocan los PAOP siguiendo el cambio de DO a 340nm (Witko-Sarsat *et al.*1998). **Fragmentación del ADN:** Los leucocitos lavados se lisan y se ultracentrifugan para separar la cromatina intacta (sedimento) del ADN fragmentado (sobrenadante). Ambas fracciones se tratan con el reactivo de Burton's (Gibb *et al.*, 1997). Se calcula el porcentaje de fragmentación del ADN como porcentaje de ADN en el sobrenadante con respecto al ADN total (Ray, 1992; Gibb *et al.*, 1997). El **MDA** (MDA + 4-hidroxi-alquenos) se midieron como indicador de la peroxidación lipídica utilizando el método colorimétrico que utiliza el 1-metil-2-fenil indol como cromógeno (Esterbauer & Cheeseman 1990). **Potencial de Peroxidación (PP):** Consiste en inducir los procesos de peroxidación lipídica por catálisis con  $\text{Cu}^{2+}$ (2mM) en una muestra biológica (suero preferentemente) para conocer el balance entre factores pro-oxidantes y antioxidantes, basándose en mediciones de la formación de Manoldialdehído (MDA) antes y después de la inducción ( Ozdemirler *et al.* 1995). **Catalasa:** Se fundamenta en el seguimiento de la variación en la D.O. (longitud de onda 240 nm) que tiene lugar durante la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la

catalasa. **Superóxido dismutasa** se utilizó el método del Pirogallol que en medio básico se autooxida generado en el medio de reacción radicales superóxido (Yi Sun *et la.*, 1988).

## RESULTADOS Y DISCUSION

La aplicación de métodos diagnósticos del estado *redox*, basados en el análisis integral de marcadores de daño a biomoléculas, indicadores globales del estado *redox*, enzimas antioxidantes y antioxidantes de bajo peso molecular, permitió establecer un sistema de diagnóstico clínico rápido (72 h), que emplea métodos analíticos basados en la colorimetría (accesible a cualquier laboratorio clínico) adaptables a sistemas de micro y ultramicro análisis, con un costo estimado relativamente bajo (50 USD).

La puesta en práctica del sistema de diagnóstico permitió establecer los valores de referencia normales para individuos sanos, caracterizar grupos de pacientes con patologías estrechamente vinculadas al desbalance *redox* como pacientes VIH/SIDA Fig.1 (*Pharmacological Research 2003, in press*), pacientes diabéticos con complicaciones macro y microangiopáticas (Fig. 2). Adicionalmente permitió el seguimiento evolutivo de grupos de pacientes sometidos a intervención antioxidante dietética o farmacológica (*Free Radicals Research 36(1):107-109; Revista Cubana de Farmacia 36 (Sup.2): 168-170. ISSN0034-7515.*). Por otra parte el sistema de diagnóstico fue aplicado a pacientes individuales con trastornos neurodegenerativos de diferente origen (Fig. 3) poniéndose en evidencia su utilidad en el diagnóstico diferenciado de cada paciente, el reajuste de su terapia y la corrección específica de su patología de base.

## CONCLUSIONES:

El diagnóstico *redox* basado en la medición de indicadores de daño a biomoléculas, indicadores globales del estado *redox*, enzimas antioxidantes y antioxidantes de bajo peso molecular constituye una herramienta de gran utilidad para la práctica clínica en el establecimiento de diagnósticos individualizados, seguimiento evolutivo de patologías y ensayo de nuevos procedimientos terapéuticos.

## **Bibliografía:**

- Esterbauer H y Cheeseman K.H. (1990). *Meth. Enzymol.* 186: 407-421.
- Gibb, R. K.; Taylor, D. D.; Wan, T.; *et al.* (1997). Apoptosis as measure of chemosensitivity. *Ginecol. Oncol.* **65**, 13-22.
- Jorge Pérez Ávila, Mariela Guevara García, Lisset Gil del Valle, *et al.* (2002) *Revista Cubana de Farmacia* **36** (Sup.2): 168-170. ISSN0034-7515.
- Lizette Gil, Alicia Tarinas, Gregorio Martínez, *et al.* *Acta Farmacéutica Bonaerense*. Vol. **21**, N° 4, 2002: 301-8.
- Mohamed, S., Martínez, G., Candelario-Jalil, E, León Fernández OS, *et al.* *Pharmacological Research.* **44**(5), 391-396, 2001.
- Mohamed, S., Menéndez, S., Martínez, G., León Fernández OS, *et al.* Proceedings of the 15th Ozone World Congress. London, United Kingdom (11-15 sept., 2001) p. 163-173.
- Motchnik, P. A.; Frei, B.; Ames, B. N. (1994). *Methods in Enzimology* **234**: 269-279.
- Ozdemiler G. *et al.*: (1995). *Horm. Metab. Res.* **27**: 194-96.
- Ray, S. D.; Kamendulis, M. L.; Gurule, W. M.; *et al.* (1993). *FASEB J.* **156**, 453-463.
- Sedlak, J.; Lidsay, R. H. (1968). *Anal. Biochem.* **25**, 192-205.
- Witko-Sarsat, V; Friedlander, M; *et al.* (1998) *J Immunol* **161**: 2524-2532.
- Yi Sun *et la.* (1988). *Clinical Chemistry* **34**, 497

Figura 1

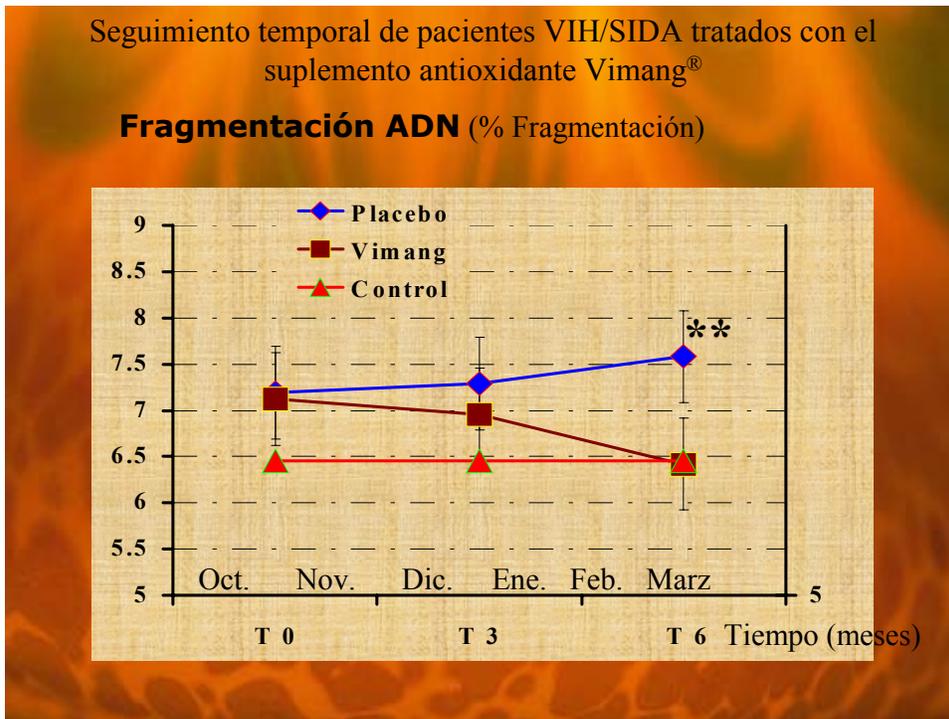


Figura 2

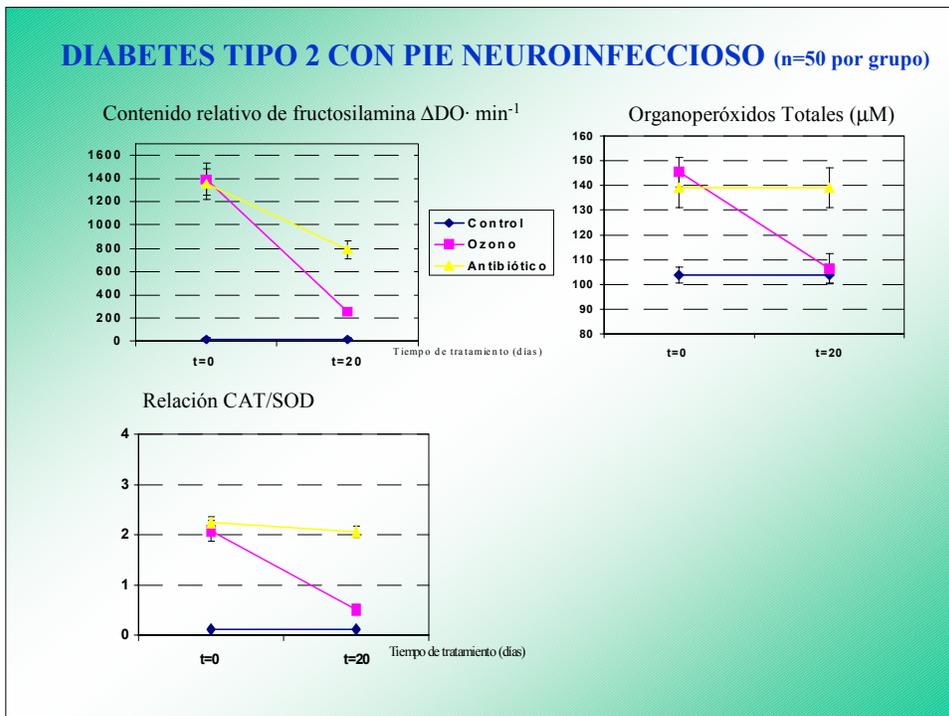
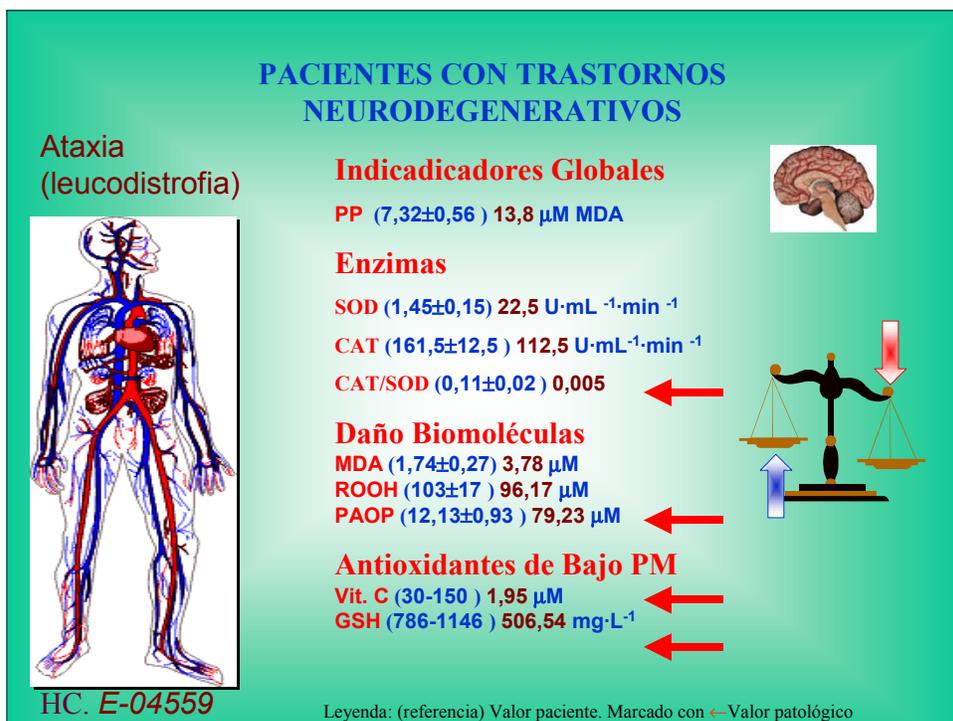


Figura 3



Memorias del la II Conferencia Inter Americana de Farmacia y Nutrición  
Organizado por: Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba  
Con el Auspicio de: Colegio de Ciencias de La Salud, Boston, Massachussets, USA

© Revista Cubana de Farmacia Vol. 37 año 2003, Suplemento Especial ISSN 0034-7515